



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 196 988<sup>(13)</sup> C2  
(51) МПК<sup>7</sup> G 01 N 33/48

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000110089/14, 19.04.2000

(24) Дата начала действия патента: 19.04.2000

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2002

(46) Дата публикации: 20.01.2003

(56) Ссылки: PHILIP P. DEMBURE et. al. Screening for Mucopolysaccharidosis by Analysis of Urinary Glucosaminoglycans. Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual, p.p. 77-86, 1991, Wiley-Liss, Inc. RU 2083205 C1, 10.07.1997. RU 2105978 C1, 27.02.1998.

(98) Адрес для переписки:  
630047, г.Новосибирск, ул. Залесского, 6,  
корп.7, Государственный новосибирский  
областной клинический диагностический центр

(71) Заявитель:

Государственный новосибирский областной  
клинический диагностический центр

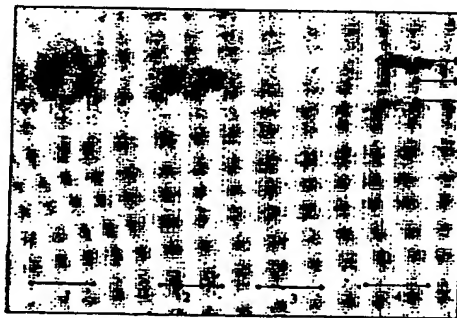
(72) Изобретатель: Пауль Г.А.,  
Русова Т.В.

(73) Патентообладатель:  
Государственный новосибирский областной  
клинический диагностический центр

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ МУКОПОЛИСАХАРИДОВ

(57)

Изобретение относится к медицине, а именно к медицинской генетике, и может быть использовано для диагностики заболеваний, связанных с нарушением обмена соединительной ткани врожденной и приобретенной этиологии. Сущность способа в том, что проводят разрушение отдельных видов гликозаминогликанов, воздействуя специфическими ферментами хондроитиназами АС и АВС, затем проводят одноступенчатый одномерный электрофорез. Изобретение обеспечивает высокоспецифичность и простоту способа. 2 ил.



ХС  
ДС  
ГС

Фиг. 1

RU 2 196 988 C 2

RU 2 196 988 C 2

BEST AVAILABLE COPY

English abs. on reverse

DI X 1-3, 5-7, 13, 25, 27-29, 32-33, 39, 52



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 196 988** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **G 01 N 33/48**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000110089/14, 19.04.2000

(24) Effective date for property rights: 19.04.2000

(43) Application published: 10.05.2002

(46) Date of publication: 20.01.2003

(98) Mail address:  
630047, g. Novosibirsk, ul. Zaleskogo, 6,  
korp. 7, Gosudarstvennyj novosibirskij  
oblastnoj klinicheskij diagnosticheskij tsentr

(71) Applicant:  
Gosudarstvennyj novosibirskij oblastnoj  
klinicheskij diagnosticheskij tsentr

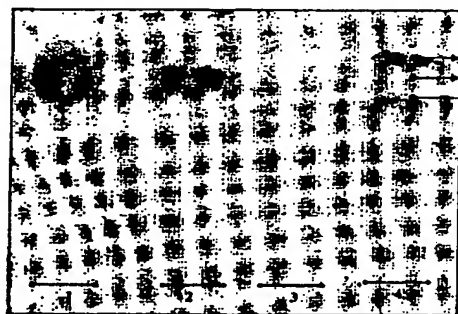
(72) Inventor: Paul' G.A.,  
Rusova T.V.

(73) Proprietor:  
Gosudarstvennyj novosibirskij oblastnoj  
klinicheskij diagnosticheskij tsentr

**(54) METHOD FOR DIAGNOSTICS OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS**

**(57) Abstract:**

FIELD: medicine, medicinal genetics.  
SUBSTANCE: method could be used to predict  
diseases associated with the disorders in  
the exchange of connective tissue of  
congenital and acquired etiology. The method  
deals with destruction of separate types of  
glycosaminoglycans by affecting with  
specific enzymes chondroitinases AC and ABC.  
Then a single-stage unidimensional  
electrophoresis is carried out. EFFECT:  
higher efficiency and simplicity. 2 dwg, 2 ex



XC  
AC  
GC

Fig. 1

RU 2 196 988 C2

RU 2 196 988 C2

Изобретение относится к медицине, а именно к медицинской диагностике, и может быть использовано для диагностики заболеваний, связанных с нарушением обмена соединительной ткани врожденной и приобретенной этиологии.

Известен способ определения вида гликозаминогликанов путем хроматографии (Pennock С.А. "A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glucosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses". J. Clin. Path., 1976, 29, 111-123).

Данный способ недостаточно специфичен за счет того, что заряд гликозаминогликанов определяется степенью его полимерности и количеством сульфатированных групп; многоступенчатый, трудоемкий, для его осуществления необходимы дорогостоящее оборудование и реактивы.

Наиболее близким к заявляемому является способ определения гиперэкскреции и видов гликозаминогликанов методом электрофореза (Philip P. Dembure and R. August Roesel "Screening for Mucopolysaccharidoses by Analysis of Urinary Glucosaminoglycans." Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual, p.p.77-86, 1991, Wiley - Liss, Inc.), который осуществляется следующим образом: выделяются гликозаминогликаны из мочи методом Pennock С. А. (1976) в модификации. Изолированные гликозаминогликаны и стандарты растворяются в дистиллированной воде в концентрации 0,5 мг/мл.

Электрофорез проводится на приборе горизонтального электрофореза фирмы Bio-Rad. Гликозаминогликаны и стандарты в количестве 5-10 мкг наносятся на ацетатцеллюлезную мембрану Optiphor-10. Проводится I этап электрофореза в течение 10 мин при напряжении 25В/СМ. Затем мембрана помещается в 15% раствор этанола в 0,1 М барийацетатном буфере на 2 мин. Проводится II этап электрофореза в течение 20 мин. Мембраны окрашиваются в 0,25% растворе Алцианового голубого, а затем окраска фиксируется 5% раствором уксусной кислоты.

Способ недостаточно специфичен за счет того, что не учитывает микрогетерогенность гликозаминогликанов, трудоемкий (многоступенчатый), требует дорогостоящего оборудования и реактивов.

Задача изобретения предложить высокоспецифичный, простой способ для диагностики мукополисахаридозов.

Поставленная задача решается за счет того, что проводят разрушение отдельных видов гликозаминогликанов, воздействуя специфическими ферментами хондроитиназами АС и АВС, затем проводят одноэтапный одномерный электрофорез.

При использовании способа имеет место положительный медицинский эффект, который заключается в диагностике заболеваний в высокой степени специфичности. Высокая специфичность достигается за счет того, что применяемые ферменты специфичны для отдельных видов гликозаминогликанов независимо от молекулярной массы, тканевой специфичности, заряда гликозаминогликанов

и, разрушая, удаляют отдельные виды гликозаминогликанов на этапе подготовки к электрофорезу.

Использование имеет социальную значимость. Специфическая диагностика дает возможность проведения пренатальной диагностики для предотвращения рождения ребенка с такой патологией в семье. При использовании способа имеет место экономический эффект: для верификации диагноза сужается диапазон дорогостоящих исследований.

Способ прост, высокоспецифичен, надежен, проводится на отечественном оборудовании.

Способ осуществляется следующим образом.

Гликозаминогликаны, выделенные из 5 мл случайной порции мочи методом Pennock С.А. (1976), растворяются в 50 мкл дистиллированной воды. К 10 мкл растворенных в воде гликозаминогликанов мочи добавляется хондроитиназа АС (EC. 4.2.2.5) или хондроитиназа АВС (EC.4.2.2.4) (Sigma, США), растворенная в 0,2 М трис-НСl буфере, содержащем 0,2 М натрийацетат, рН 8,0, в объеме 5 мкл, таким образом, чтобы конечная активность фермента в инкубационной смеси составляла не менее 0,025 ЕД/мкл. Инкубируется 3 ч при 37 °С. Останавливают реакцию охлаждением спиртом 96°, 200 мкл. Через 30 мин центрифугируется 10 мин, 3 тыс оборотов, надосадочная жидкость сливается, осадок высушивается на воздухе, растворяется в 10 мкл дистиллированной воды.

Электрофорез проводится на приборе для изотахофореза на пленке ИТФ-П2 27. Ацетатцеллюлезная мембрана "Владипор МФА-МА 5" производства "Тасма", предварительно замоченная в 0,1 М барийацетатном буфере, рН 4,8, высушивается промокательной бумагой. Пробы и стандарт (смесь гепарансульфата и хондроитинсульфата А, Sigma, США, в концентрации 1 мг/мл, водный раствор) наносятся на ацетатцеллюлезную мембрану в количестве 1 мкл полоской длиной около 5 мм. На "шероховатой" поверхности мембраны от края отступают 2 см (направление движения электрофореза вдоль волокон мембраны) и проводят линию простым карандашом без нажима (это линия старта). Затем делают разметку для нанесения проб. От края и между пробами отступают по 7-10 мм. Электрофорез проводится в 0,1 М барийацетатном буфере, рН 4,8, при напряжении 70 В в течение 90 мин, от катода к аноду. Мембрана окрашивается в 0,1% растворе Алцианового голубого в 2,5% растворе уксусной кислоты в течение 10 мин, затем окраска фиксируется 2,5% раствором уксусной кислоты.

Примеры практического использования  
Пример 1

Пациенту Л., 9 лет 9 мес с клиникой мукополисахаридоза проведено обследование. Выявлена гиперэкскреция гликозаминогликанов (36,0 мг/мМ креатинина (норма 3,2-5,6)). При проведении электрофореза выявлена гиперэкскреция ГАГ за счет хондроитинсульфатов А и С, дерматансульфат (линия 1), но нельзя исключить присутствие гепарансульфата. После обработки ГАГ хондроитиназой АС

были удалены хондроитинсульфаты А и С (линия 2), после обработки ГАГ хондроитиназой АВ были удалены хондроитинсульфаты А и С, а также дерматансульфат (хондроитинсульфат В) (линия 3). Линия 4: стандарт (ГС - гепарансульфат; ХС - хондроитинсульфатов А и С; ДС - дерматансульфат). Заключение: Гиперсекреция ГАГ обусловлена преимущественно за счет дерматансульфата, хондроитинсульфатов А и С, что характерно для мукополисахаридоза. В дальнейшем у пациента необходимо исследование активности ферментов для дифференциальной диагностики типа мукополисахаридоза I, VI и VII.

#### Пример 2

Пациенту К., 3 года 10 мес, с клиникой мукополисахаридоза проведено обследование. Выявлена гиперсекреция гликозаминогликанов (20,7 мг/мМ креатинина (норма 4,4-8,0)). При проведении электрофореза выявлена гиперсекреция ГАГ за счет хондроитинсульфатов А и С (линия 1), но нельзя исключить присутствие кератансульфата. После обработки ГАГ

хондроитиназой были удалены хондроитинсульфаты А и С (линия 2), после обработки ГАГ хондроитиназой АВС были удалены хондроитинсульфаты А и С, а также дерматансульфат (хондроитинсульфат В) (линия 3). Линия 4: стандарт (ГС - гепарансульфат; ХС - хондроитинсульфатов А и С; ДС - дерматансульфат). Заключение: Гиперсекреция ГАГ обусловлена за счет хондроитинсульфатов А и С. В дальнейшем у пациента определено отсутствие активности арилсульфатазы А и В, выставлен диагноз мукосүльфатидоза. Это заболевание не относится к мукополисахаридозам.

#### Формула изобретения:

Способ диагностики мукополисахаридозов путем определения гиперсекреции и видов гликозаминогликанов (ГАГ), отличающийся тем, что проводят разрушение отдельных видов ГАГ, воздействуя специфическими ферментами хондроитиназами АС и АВС, затем проводят одноэтапный одномерный электрофорез, и при выявлении гиперсекреции ГАГ, обусловленной дерматансульфатом и хондроитинсульфатом А и С, диагностируют мукополисахаридоз.

RU 2196988 C2

RU 2196988 C2

RU 2196988 C2



Фиг.2

RU 2196988 C2